

捻转血矛线虫半胱氨酸蛋白酶对山羊 PBMCs 免疫功能的影响

胡孟娟, 周丽娜, 牛延萍, 徐立新, 宋小凯, 李祥瑞, 严若峰*

(南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

摘要: 旨在探究捻转血矛线虫半胱氨酸蛋白酶(Hc58)对山羊外周血单个核细胞(PBMCs)免疫功能的影响。采集健康山羊血液, 分离出 PBMCs 和单核细胞, 分别以质量浓度为 0、10、20、40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的重组蛋白 Hc58 与细胞体外共培养, 采用硝酸还原酶法测定不同浓度 Hc58 对单核细胞分泌一氧化氮(NO)的影响; 采用流式细胞术检测重组蛋白对单核细胞吞噬 FITC-dextran 能力的影响; 采用荧光定量 PCR 检测 PBMCs 中 IL-2、IL-4、IL-10、IL-17、IFN- γ 和 TGF- β 的 mRNA 转录情况; 采用迁移小室研究重组蛋白对 PBMCs 迁移的影响; 采用流式细胞术检测不同浓度 Hc58 对 PBMCs 凋亡的影响。研究表明重组蛋白 Hc58 显著促进山羊单核细胞分泌 NO; 并且增强了山羊单核细胞的吞噬能力; Hc58 显著上调 IL-2、IL-4、IL-17、IFN- γ 的表达量; Hc58 显著提高山羊 PBMCs 凋亡比例, 也使 PBMCs 迁移率增加。捻转血矛线虫半胱氨酸蛋白酶能通过多种途径影响宿主 PBMCs 发挥免疫作用。

关键词: 捻转血矛线虫; 半胱氨酸蛋白酶; 山羊; 外周血单个核细胞; 流式细胞术

中图分类号: S852.73

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)04-0804-07

Effects of *Haemonchus contortus* Cysteine Protease on Immune Functions of Goat PBMCs

HU Meng-juan, ZHOU Li-na, NIU Yan-ping, XU Li-xin,

SONG Xiao-kai, LI Xiang-rui, YAN Ruo-feng*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The present study was designed to investigate the effects of *Haemonchus contortus* Cysteine protease on immune functions of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of goat. PBMCs were separated from goat blood sample, monocytes were isolated from PBMCs because of their adherent growth. Recombinant protein of different concentrations (0, 10, 20, 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) was cultured with PBMCs or monocytes *in vitro*. Nitric oxide (NO) secretion was measured by nitrate reductase assay. Cell migration was tested by Cell Culture Inserts. The mRNA transcriptional levels of IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, IFN- γ and TGF- β were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. Then cell phagocytosis and apoptosis were calculated by flow cytometry. The result revealed that Hc58 was able to dramatically enhance NO release and phagocytosis of monocytes. Hc58 might significantly up-regulate the production of IL-2, IL-4, IL-17 and IFN- γ . Furthermore, it also could notably increase apoptosis ratio and migration of PBMCs. There were signs that *Haemonchus contortus* Cysteine protease impacted on the immune functions of goat PBMCs via different pathways.

Key words: *Haemonchus contortus*; cysteine protease (Hc58); goat; peripheral blood mononuclear cells; flow cytometry

收稿日期: 2017-09-14

基金项目: 中央高校基本科研业务费(KYYJ201710); 国家重点基础发展研究计划(973 计划)(2015CB150300); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

作者简介: 胡孟娟(1991-), 女, 硕士生, 主要从事寄生虫分子与免疫研究, E-mail: 2015107074@njau.edu.cn, Tel: 025-84395904

* 通信作者: 严若峰(1976-), 博士, 教授, 主要从事兽医寄生虫分子与免疫研究, E-mail: yanruofeng@njau.edu.cn

捻转血矛线虫寄生于牛、羊、骆驼等反刍动物皱胃,吸食宿主血液,繁殖力高,流行广泛,致病性强^[1]。宿主感染该病原易引起严重胃炎、贫血、腹泻等^[2],大量感染致使幼龄动物死亡,对全世界畜牧业产生巨大威胁,并造成严重经济损失^[3]。因此,研究并开发出一种有效的疫苗来防治该病尤为重要。随着各方面研究的深入,人们逐步认识到,要想研制有效的疫苗,必须深入了解捻转血矛线虫寄生过程中的一些重要问题,包括线虫侵入宿主机制、消化道附着机制、吸血机制和免疫抑制机制等^[4]。

半胱氨酸蛋白酶(cysteine protease, CP)是一类重要的细胞内蛋白酶,在生物进化过程中非常保守,其活性中心含有半胱氨酸残基,广泛存在于各种生物体中^[5]。近年来对寄生虫半胱氨酸蛋白酶研究颇多,如弓形虫、旋毛虫、肝片吸虫等,研究发现该酶参与寄生虫摄取营养、免疫逃避、在宿主体内移行等过程,是一种良好的疫苗候选抗原。利用 Race 技术克隆捻转血矛线虫半胱氨酸蛋白酶(Hc58),并对其序列和蛋白质功能进行分析,结果表明该基因全长序列为 851 bp,编码 217 个氨基酸,该蛋白质属于木瓜蛋白酶类的 C1 族组织蛋白酶 B 样蛋白酶,可能在捻转血矛线虫的吸血过程和和宿主体内存活起到重要作用^[6]。同时构建了捻转血矛线虫 Hc58 DNA 疫苗,并进行了山羊免疫保护性试验,研究发现每克粪便虫卵数、虫卵孵化率和皱胃荷虫数比对照组分别减少了 28.02%、47.6% 和 28.3%,结果表明 Hc58 DNA 疫苗具有较好的免疫保护效果^[7]。本试验通过体外试验分析 Hc58 对山羊 PBMCs 的影响,结果对了解该蛋白质诱导宿主免疫保护机制具有一定意义。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 3~6 月龄健康山羊,购自南京某郊区养殖场。

1.1.2 质粒与菌种 pET-28a-Hc58 质粒,大肠杆菌 BL21 均由本实验室保存。

1.1.3 主要工具酶和试剂 限制性核酸内切酶 *Bam*H I、*Hind*III 购自大连宝生物(TaKaRa)工程有限公司;Pierce[®] BCA Protein Assay Kit 蛋白定量分析试剂盒购于美国 Thermo 公司;淋巴细胞分离液为天津灏洋生物公司产品;RPMI1640 培养基、DMEM 培养基及胰酶消化液均购于 Gibco 公司;胎

牛血清购自 Life technologies 公司;12 孔、24 孔、96 孔 Costar[®] 细胞培养板购自 Corning 公司;E. Z. N. A[™] Total RNA kit I 为 OMEGA 公司产品;总一氧化氮检测试剂盒购自碧云天公司;Millcell[®] Hanging Cell Culture Inserts 购自 Merck-Millipore 公司;HiScript[™] Q RT SuperMix for qPCR 试剂盒、ChamQ[™] SYBR[®] qPCR Master Mix 均购于南京诺唯赞公司;Annexin V-FITC Kit 购自南京福麦斯生物公司;FITC-dextran 为美国 Sigma 公司产品;其余试剂为国产分析纯。

1.1.4 主要仪器与设备 ImageQuant300 凝胶成像分析系统(美国 GE 公司),5417R 冷冻台式离心机(德国 Eppendorf 公司),Thermo Scientific 8000 CO₂ 细胞恒温培养箱(Thermo),ABI7500 荧光定量 PCR 仪,PCR 扩增仪(日本 TaKaRa),BD FACSCalibur 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 重组质粒的鉴定与表达 将重组质粒转化至大肠杆菌 BL21 感受态细胞中,随机挑取单菌落,提取质粒用 *Bam*H I、*Hind*III 进行双酶切鉴定,将阳性质粒送去南京擎科生物公司进行测序。将测序正确的菌液接种于含 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Kana 抗生素的液体 LB 培养基中,次日以 1:100 接种于 1 000 mL 液体 LB 培养基中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床 180 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇至 OD_{600 nm} 值为 0.4~0.6,加入 IPTG 使其终浓度为 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 继续诱导 5 h。收集菌体,超声破碎,SDS-PAGE 检测菌体分布在上清或包涵体。

1.2.2 重组蛋白质的纯化 参照说明书使用镍柱吸附蛋白质原理对重组蛋白质进行纯化,经 SDS-PAGE 检测后,将重组蛋白质放入含梯度浓度尿素的复性缓冲液中分别复性透析 8 h,经聚乙二醇浓缩后,测定浓度,过滤除菌分装冻存。

1.2.3 山羊 PBMCs 和单核细胞的分离与培养

从健康山羊颈静脉中无菌采取抗凝血,参照淋巴细胞分离液说明书分离 PBMCs。台盼蓝染色观察活细胞在 95% 以上。将收集的 PBMCs 用含 1% 的双抗和 10% 胎牛血清的 1640 培养液吹悬混匀,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。单核细胞具有贴壁生长的特性,由此可进行分离。将分离的 PBMCs 或单核细胞与终质量浓度为 0、10、20、40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的重组蛋白质 Hc58 共孵育,置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO₂ 的细胞培养箱培养。

1.2.4 重组蛋白质对单核细胞分泌一氧化氮的影响 取“1.2.3”处理好的单核细胞悬液,每孔 1 mL,分别加入 24 孔板中,并设置 pET-28a 标签蛋白对照组,每组三个重复。培养 24 h 后,离心取细胞上清,按照碧云天总 NO 检测说明书进行测定。

1.2.5 重组蛋白质对山羊单核细胞吞噬能力的影响 将“1.2.3”处理好的单核细胞接种于 24 孔板中,每孔 1 mL,同时设置 pET-28a 标签蛋白对照组,每组三个重复。培养 48 h 后,收集细胞,每管加入 1 mL 预冷的 PBS 溶液洗涤,用 100 μ L PBS 溶液重悬细胞,再加入 100 μ L 异硫氰酸荧光素标记的葡聚糖(FITC-dextran),混匀,分别置于 4 和 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h;用预冷的含 2% FBS 的 PBS 溶液洗涤,再用 500 μ L PBS 溶液重悬细胞;转入流式管中,上流式细胞仪进行检测。参照文献[8]细胞吞噬指数 (cell phagocytosis index, PI) 计算公式 $PI = MFI_{\text{试验组}} / MFI_{\text{细胞对照组}}$ 对试验数据进行处理。

1.2.6 重组蛋白质对 PBMCs 分泌细胞因子的影响 取 24 孔板,每孔 1 mL 加入“1.2.3”处理好的 PBMCs 细胞悬液,设置 pET-28a 标签蛋白对照组,每组三个重复。培养 24 h 后,参照总 RNA 提取试剂盒说明书对细胞 RNA 进行提取,并反转录为 cDNA。参照文献[9]设计并合成山羊细胞因子 IL-2、IL-4、IL-10、IL-17、IFN- γ 和 TGF- β 的引物,以 β -actin 为内参,采用荧光定量 PCR 对山羊 PBMCs 细胞因子转录水平进行测定。

1.2.7 重组蛋白质对 PBMCs 迁移的影响 取 24 孔板,每孔加入“1.2.3”处理好的 PBMCs 细胞悬液 1 mL,同时设置 pET-28a 标签蛋白对照组,每组三个重复,培养 24 h 后,进行细胞计数;再嵌入迁移小室,培养 2 h 后,收集迁移至下室的细胞,经过计数,算出细胞的迁移率。

1.2.8 重组蛋白质对 PBMCs 凋亡的影响 于 24 孔板中分别加入“1.2.3”处理好的 PBMCs 细胞悬液 1 mL,并设置 pET-28a 标签蛋白对照组,每组三个重复。培养 48 h 后,收集细胞于 1.5 mL Eppendorf 管中,500 g 离心 5 min,弃上清;用预冷的 1 \times Binding Buffer 洗涤两遍;100 μ L 1 \times Binding Buffer 重悬细胞;再加入 10 μ L Annexin V-FITC;轻轻吹打混匀,避光孵育 15 min;再用 1 \times Binding Buffer 洗涤两遍,弃上清,加入 500 μ L 1 \times Binding Buffer 和 5 μ L 碘化丙啶(propidium iodide),轻轻混匀,转入流式管,上机检测细胞凋亡。

1.3 数据处理

数据使用 GraphPad Prism 6 进行分析,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 捻转血矛线虫 Hc58 的鉴定表达与纯化

重组原核表达质粒 pET-28a-Hc58 经 BamH I 和 Hind III 酶切鉴定,显示有一条载体条带和一条 850 bp 左右的目的片段,结果与预测相符。将重组质粒转入大肠杆菌进行诱导表达,重组蛋白主要以包涵体的形式存在,获得的融合蛋白相对分子质量约为 27 ku(图 1)。

2.2 重组蛋白质对山羊单核细胞分泌 NO 的影响

单核细胞与不同浓度的重组蛋白 Hc58 作用后,在质量浓度为 20 和 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,能显著 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$) 增强单核细胞分泌 NO,而在质量浓度为 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,影响不明显(图 2)。本研究中,pET-28a 标签蛋白对照组与细胞对照组无显著差异,说明融合蛋白质中标签蛋白对试验无影响。

2.3 重组蛋白质对山羊单核细胞吞噬能力的影响

与细胞对照组相比,试验组中 3 种质量浓度的重组蛋白质 Hc58 均能显著 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$) 促进山羊单核细胞的吞噬能力(图 3)。

2.4 重组蛋白质对山羊 PBMCs 分泌细胞因子的影响

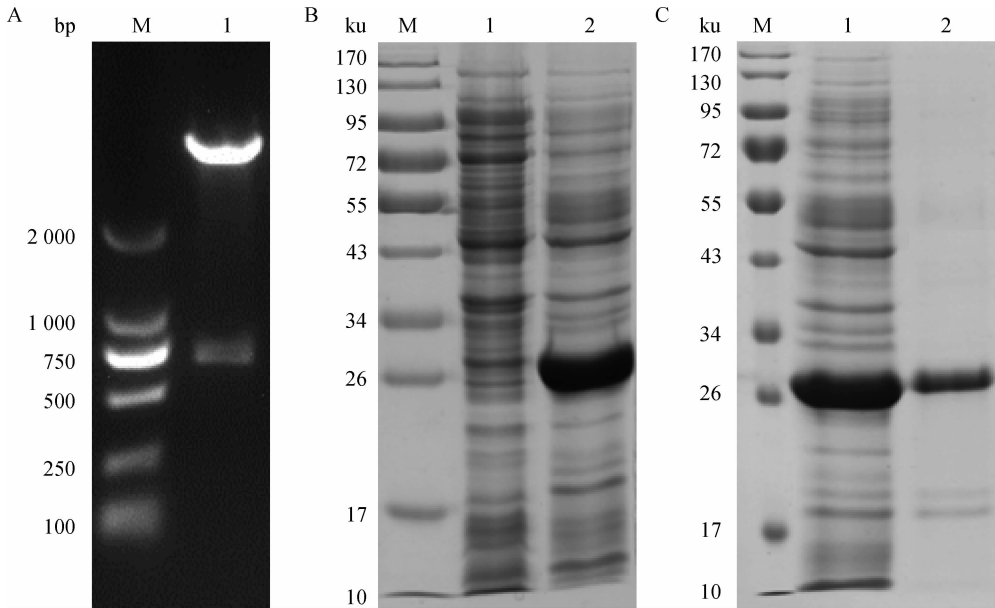
重组蛋白质 Hc58 刺激 PBMCs 后,3 个试验组中,IL-2、IL-4、IL-17 转录量均显著 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$) 高于细胞对照组;当蛋白质质量浓度为 10 和 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,IFN- γ 转录量极显著 ($P < 0.001$) 高于细胞对照组,而 IL-10、TGF- β 变化不明显(图 4)。

2.5 重组蛋白质对山羊 PBMCs 迁移能力的影响

试验结果显示,3 种浓度的重组蛋白质 Hc58 与 PBMCs 作用后,蛋白质质量浓度为 20 和 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,能显著 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$) 促进山羊 PBMCs 的迁移,作用效果随着 Hc58 的浓度增加而增强(图 5)。

2.6 重组蛋白质对山羊 PBMCs 凋亡的影响

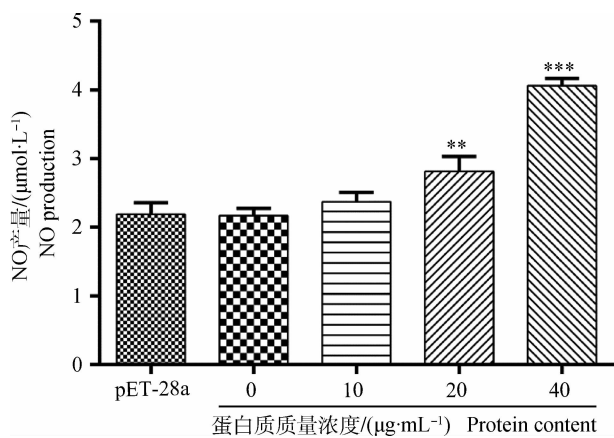
本试验中,PBMCs 经不同浓度的 Hc58 作用后,细胞凋亡的比例呈剂量依赖性。其中,20 和 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的重组蛋白质能极显著的促进细胞凋亡 ($P < 0.001$) (图 6、图 7)。



A. 重组质粒 pET-28a-Hc58 的双酶切鉴定(M. DNA 相对分子质量标准; 1. pET-28a-Hc58 经 *Bam*H I、*Hind* III 的酶切产物); B. 重组蛋白 Hc58 的分布(M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 表达产物上清; 2. 表达产物沉淀); C. 重组蛋白 Hc58 的纯化(M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 纯化前包涵体蛋白; 2. 纯化后包涵体蛋白)
A. Identification of recombinant plasmid pET-28a-Hc58 by restriction enzyme digestion (M. DNA marker; 1. pET-28a-Hc58 digested by *Bam*H I and *Hind* III); B. Distribution of recombinant Hc58 (M. Protein marker; 1. Supernatant of expression products; 2. Precipitate of expression productions); C. Purification of recombinant Hc58 (M. Protein marker; 1. Inclusion body without purification; 2. Purified protein from inclusion body)

图 1 Hc58 基因的鉴定表达与蛋白质纯化

Fig. 1 Identification, expression and purification of recombinant Hc58



与细胞对照组($0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)相比, ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ 。下图同

Compared with the control group ($0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), ** $P<0.01$; *** $P<0.001$. The same as follow

图 2 重组蛋白质 Hc58 对山羊单核细胞分泌 NO 的影响

Fig. 2 Effect of recombinant Hc58 on the NO production of goat monocytes

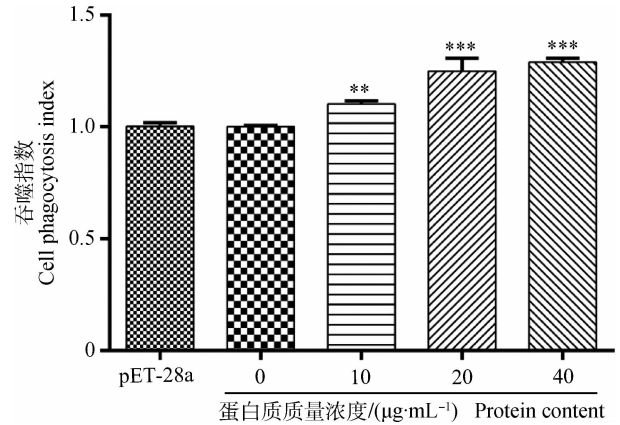


图 3 重组蛋白质 Hc58 对山羊单核细胞吞噬功能的影响

Fig. 3 Effect of recombinant Hc58 on the phagocytosis of goat monocytes

3 讨论

寻找具有免疫保护效果的虫体抗原是捻转血矛线虫疫苗研究的一个重要方向。研究发现一些膜内

分泌蛋白,尤其是酶类,不仅具有很强的抗原性,而且在同一虫体的不同发育时期均有分泌,参与虫体的入侵、吸附、繁殖、免疫逃避等过程,并在寄生虫与宿主之间的相互作用中扮演重要角色^[10]。捻转血矛线虫半胱氨酸蛋白酶 Hc58 分布于肠微绒毛表面,具有血凝活性,可降解山羊血红蛋白、IgG 和纤维蛋白原,具有显著的免疫原性^[11]。

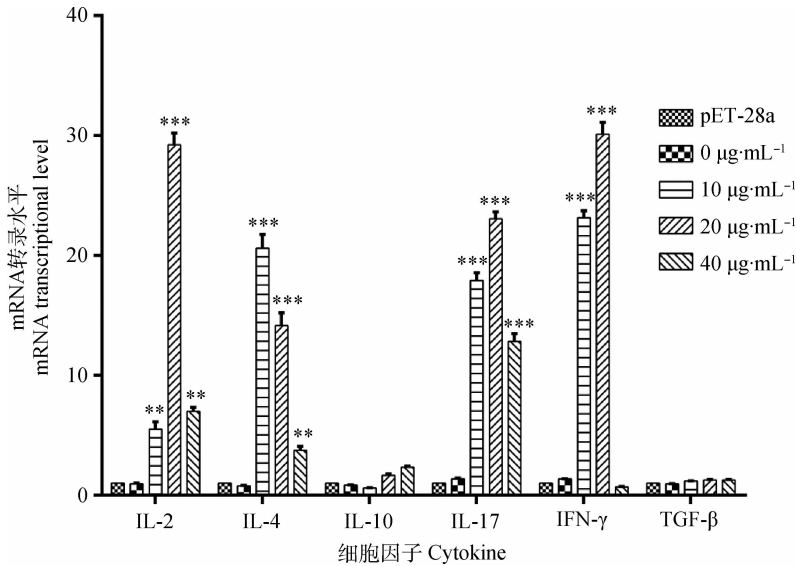


图4 重组蛋白质 Hc58 影响山羊 PBMCs 多种细胞因子 mRNA 转录情况

Fig. 4 The mRNA transcriptional level of multiple cytokines in PBMCs of goat stimulated by recombinant Hc58

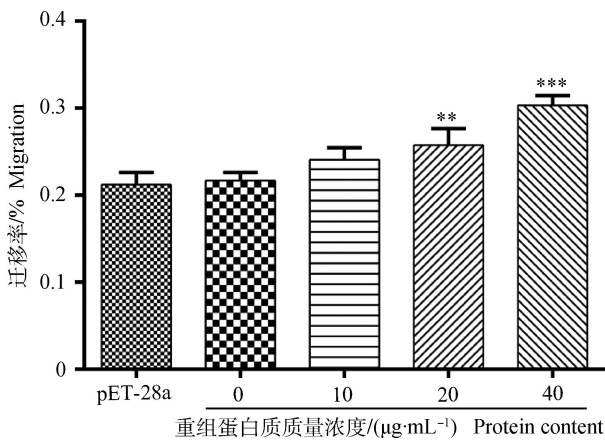


图5 重组蛋白质 Hc58 对山羊 PBMCs 迁移的影响

Fig. 5 Effect of recombinant Hc58 on the migration of goat PBMCs

外周血单个核细胞(PBMCs)指外周血中具有单个核的细胞,包括淋巴细胞、单核细胞、树突状细胞等,是免疫系统功能研究的重要成分^[12]。笔者从细胞吞噬、迁移等几个方面进一步研究重组蛋白 Hc58 对 PBMCs 免疫功能的影响,为阐释捻转血矛线虫与宿主之间的免疫机制奠定基础。

NO 是体内重要的信使分子,参与细胞杀伤、内分泌激素的释放等过程,与许多疾病的发生、发展密切相关^[13]。研究表明,NO 在机体抵抗锥虫、疟原虫、血吸虫、利什曼原虫等大多数寄生虫感染过程中发挥重要作用^[14]。吴玲燕等^[12]研究表明,捻转血矛线虫重组蛋白 NDUDC 刺激山羊 PBMCs 能够促

进 NO 的分泌,且呈剂量依赖性。而本试验中,20 和 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 重组蛋白质 Hc58 刺激单核细胞后,也能显著促进单核细胞释放 NO。而且单核细胞或巨噬细胞被活化后,吞噬能力增强,能清除体内病原体和损伤的细胞^[15]。本试验发现重组蛋白质 Hc58 能显著增强单核细胞的吞噬功能,加强了机体的防御能力。

Th1、Th2 类免疫和炎症反应分泌的细胞因子在抵抗寄生虫感染中起重要的作用^[16]。IL-2 和 IFN- γ 由 Th1 类细胞分泌,IL-4 由 Th2 类细胞分泌。IL-2 可刺激 T 细胞增殖而增强细胞毒性 T 细胞和自然杀伤细胞的活性。IFN- γ 可刺激巨噬细胞活化,增强其抗原提呈能力。IL-4 可促进 B 细胞的生长增殖及分泌 IgE 抗体^[17]。IL-17 由 Th17 类细胞分泌,主要是在机体受到真菌或其他外源物质攻击时通过在感染部位募集中性粒细胞发挥作用^[18]。而 IL-10 和 TGF- β 则由 Treg 细胞分泌,TGF- β 则可能是机体关闭免疫应答的信号,对各类免疫细胞均具有抑制作用^[19]。Y. L. Wen 等^[15] 和 M. Ehsan 等^[16] 研究发现,捻转血矛线虫重组蛋白 Miro-1、精氨酸激酶可通过 Th1、Th2 和 Th17 来调节寄生虫与宿主之间的免疫应答,其中 Th2 类免疫占主导作用。而本试验中 IL-2、IL-4、IFN- γ 、IL-17 转录水平变化明显,IL-10、TGF- β 变化不明显,且 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 重组蛋白 Hc58 试验组 IL-2、IFN- γ 转录水平极显著高于对照组($P < 0.001$),变化最为明显,表明 Hc58 可诱导 Th1、Th2、Th17 类细胞分泌细胞因子调节宿

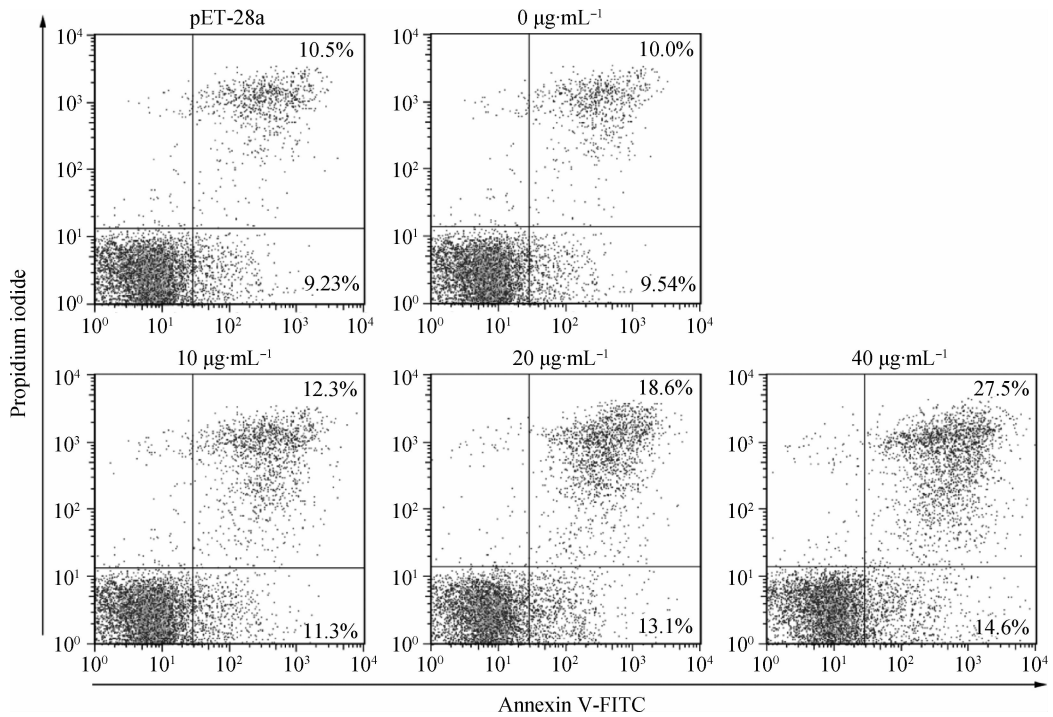


图 6 双染流式分析

Fig. 6 The flow cytometry picture showed double staining by Annexin V-FITC and Propidium iodide

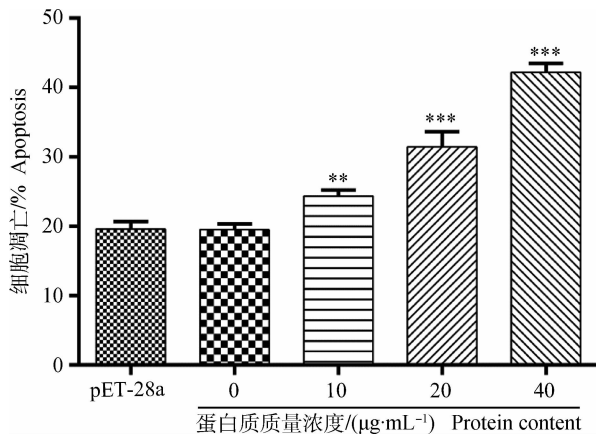


图 7 重组蛋白质 Hc58 对山羊 PBMCs 凋亡的影响

Fig. 7 Effect of recombinant Hc58 on the apoptosis of goat PBMCs

主的免疫功能,且主要诱导 Th1 类免疫反应。

细胞迁移是机体正常发育和生理活动的基础,在胚胎发育、免疫防御、损伤修复以及肿瘤转移等许多生理和病理过程中发挥核心作用^[20]。当宿主感染病原体时,为了防止其入侵,免疫细胞会向感染部位迁移,参与机体的免疫防御。本次试验表明,高浓度的 Hc58 能显著增加 PBMCs 的迁移率,有利于机体清除病原菌和有害物质。

细胞凋亡是由基因控制的细胞主动性死亡过

程,受多种基因的调控,对疾病的预防与诊治有着重要的意义。本研究中作者发现重组蛋白 Hc58 能显著诱导山羊 PBMCs 的凋亡,对促进衰老损伤细胞的清除、生物体进化、机体内环境稳态的维持等有着重要作用。本试验仅初步研究了重组蛋白质对 PBMCs 凋亡的作用,至于其如何诱导细胞凋亡机制和信号传导途径尚不清楚,有待于深入探索。

本文通过重组蛋白质 Hc58 与山羊 PBMCs 共同作用,体外试验测定其部分免疫指标,了解到该蛋白质对 PBMCs 发挥免疫功能具有重要意义,后续会通过体内试验进一步研究 Hc58 对山羊免疫保护机制的影响。

4 结论

体外试验表明重组蛋白质 Hc58 具有促进 NO 分泌和细胞的吞噬作用,上调 IL-2、IL-4、IL-17 和 IFN- γ 的表达,显著增强细胞迁移和凋亡,可通过多种途径影响山羊 PBMCs 免疫功能的发挥。

参考文献 (References):

- [1] JASSO DÍAZ G, HERNÁNDEZ G T, ZAMILPA A, et al. *In vitro* assessment of *Argemone mexicana*, *Taraxacum officinale*, *Ruta chalepensis* and

- Tagetes filifolia* against *Haemonchus contortus* nematode eggs and infective (L₃) larvae [J]. *Microb Pathog*, 2017, 109: 162-168.
- [2] BESIÉ R B, KAHN L P, SARGISON N D, et al. The pathophysiology, ecology and epidemiology of *Haemonchus contortus* infection in small ruminants [J]. *Adv Parasitol*, 2016, 93: 95-143.
- [3] RODRÍGUEZ-VIVAS R I, GRISI L, DE LEÓN A A P, et al. Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review [J]. *Rev Mex Cienc Pecu*, 2017, 8(1): 61-74.
- [4] KNOX D P, REDMOND D L, NEWLANDS G F, et al. The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for *Haemonchus contortus* and other ruminant trichostrongyloids [J]. *Int J Parasitol*, 2003, 33(11): 1129-1137.
- [5] 吴凡, 李德臣, 郝瑜, 等. 家蚕半胱氨酸蛋白酶的研究进展 [J]. *蚕业科学*, 2017, 43(2): 336-340. WU F, LI D C, HAO Y, et al. Research progress on cysteine protease of *Bombyx mori* [J]. *Science of Sericulture*, 2017, 43(2): 336-340. (in Chinese)
- [6] MULEKE C I, YAN R F, XU L X, et al. Characterization of HC58cDNA, a putative cysteine protease from the parasite *Haemonchus contortus* [J]. *J Vet Sci*, 2006, 7(3): 249-255.
- [7] MULEKE C I, YAN R F, SUN Y M, et al. Cellular immune response and abomasum worm burden in goats vaccinated with HC58cDNA vaccine against *H. contortus* infection [J]. *Adv Life Sci Technol*, 2013, 13: 26-33.
- [8] LI Y, YUAN C, WANG L K, et al. Transmembrane protein 147 (TMEM147): another partner protein of *Haemonchus contortus* galectin on the goat peripheral blood mononuclear cells (PBMC) [J]. *Parasit Vectors*, 2016, 9: 355.
- [9] 牛延萍. 捻转血矛线虫过氧化物酶基因的克隆和 5 种蛋白的抗原特性分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012. NIU Y P. Cloning of peroxidase and antigenic characteristics analysis of five proteins in *Haemonchus contortus* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012. (in Chinese)
- [10] SIBLEY L D. The roles of intramembrane proteases in protozoan parasites [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1828(12): 2908-2915.
- [11] 张立武. 重组捻转血矛线虫半乳糖结合凝集素免疫山羊真胃细胞因子表达定位 [D]. 南京: 南京农业大学, 2007. ZHANG L W. Localization of cytokines in abomasum of goats immunized with recombinant galectins of *Haemonchus contortus* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007. (in Chinese)
- [12] 吴玲燕, 王玉俭, 温玉玲, 等. 捻转血矛线虫 NADH: 泛醌氧化还原酶结构域包含蛋白基因的克隆表达及功能分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(4): 722-730. WU L Y, WANG Y J, WEN Y L, et al. Cloning, expression and function analysis of NADH: ubiquinone oxidoreductase domain containing protein in *Haemonchus contortus* [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2017, 48(4): 722-730. (in Chinese)
- [13] 杨旭然, 陈庭金, 余新炳. 诱导型一氧化氮合酶与寄生虫感染的研究进展 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2016, 11(9): 855-857. YANG X R, CHEN T J, YU X B. A review of advances in the study of inducible nitric oxide synthase and parasitic infection [J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2016, 11(9): 855-857. (in Chinese)
- [14] OLEKHNOVITCH R, BOUSSO P. Induction, propagation, and activity of host nitric oxide: lessons from *Leishmania* infection [J]. *Trends Parasitol*, 2015, 31(12): 653-664.
- [15] WEN Y L, WANG Y J, WANG W J, et al. Recombinant Miro domain-containing protein of *Haemonchus contortus* (rMiro-1) activates goat peripheral blood mononuclear cells *in vitro* [J]. *Vet Parasitol*, 2017, 243: 100-104.
- [16] EHSAN M, GAO W X, GADAHJI A, et al. Arginine kinase from *Haemonchus contortus* decreased the proliferation and increased the apoptosis of goat PBMCs *in vitro* [J]. *Parasit Vectors*, 2017, 10(1): 311.
- [17] MUKAI K, TSAI M, STARKL P, et al. IgE and mast cells in host defense against parasites and venoms [J]. *Semin Immunopathol*, 2016, 38(5): 581-603.
- [18] RAPHAEL I, NALAWADE S, EAGAR T N, et al. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases [J]. *Cytokine*, 2015, 74(1): 5-17.
- [19] O'SHEA J J, PAUL W E. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4⁺ T cells [J]. *Science*, 2010, 327(5969): 1098-1102.
- [20] 宋海飞, 林博文, 龚诚宸, 等. 细胞迁移相关蛋白酶的研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2017, 44(2): 99-109. SONG H F, LIN B W, GONG C C, et al. The research progress on proteases involved in cell migration [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2017, 44(2): 99-109. (in Chinese)